

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Matouš Vobořil**

Leukemické kmenové buňky

Leukemic stem cells

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Petr Stöckbauer, CSc.

Praha, 2012

*Poděkování:*

Rád bych poděkoval především svému školiteli doc. RNDr. Petru Stöckbauerovi, CSc. za trpělivost, vstřícnost a cenné rady při psaní mé bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat všem ostatním, kteří mě při psaní podporovali a pomáhali mi.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 05. 2012

Podpis:

## **Abstrakt**

Biologie kmenových buněk se dostala do popředí nejen vědeckého, ale i klinického zájmu a je jednou z nejrychleji se rozvíjejících oblastí současného biomedicínského výzkumu. Myšlenka, že i nádorová buněčná masa obsahuje buňky vlastnostmi velmi podobné normálním kmenovým buňkám, vedla k formulaci „hypotézy nádorových kmenových buněk“. Ta praví, že každá nádorová masa obsahuje malou skupinu buněk odpovědnou za iniciaci, růst a přežívání nádoru. Vzhledem k faktu, že nádory krvetvorné tkáně byly prvními onemocněními, odkud byly nádorové respektive leukemické kmenové buňky izolovány, jsou poznatky v tomto oboru nejvíce prozkoumány. Avšak i přes obrovské pokroky, které byly učiněny, zůstává mnoho vlastností leukemických kmenových buněk nepoznaných. Tato bakalářská práce zpočátku prezentuje základní poznatky v biologii kmenových buněk včetně jejich původu a identifikace. Posléze je zaměřena na hypotézu existence nádorových kmenových buněk a na popis hlavních vlastností kmenových buněk nádorů pevných tkání. Stěžejní část práce pak dopodrobna poukazuje na původ a vlastnosti leukemických kmenových buněk včetně nových strategií terapie hematologických malignit využitelných v moderní protinádorové medicíně.

**Klíčová slova:** leukemické kmenové buňky (LSCs), nádorové kmenové buňky (CSCs), hematopoetické kmenové buňky (HSCs), progenitory, schopnost sebeobnovy, marker, nádor

## **Abstract**

The biology of stem cells came to the foreground not only due to scientific but also due to clinical interest and it is one of the most developing fields of current biomedical research. The idea, that all tumor cells contain population of cells like stem cells, leads to the „cancer stem cells hypothesis“. It says, that each tumor cell contains small population of cells capable to initiate and maintain the tumor growth. Tumors of the hematopoietic tissue were the first, where cancer or leukemic stem cells were isolated. Therefore, leukemic stem cells are so far the best understood cancer stem cells. However, despite the huge advances in the biology of leukemic stem cells, there are many properties still unknown. This thesis initially presents basic knowledges in the stem cell biology, including their origin and identification. Later it focuses on the stem cell hypothesis and describes of the main properties of stem cells in solid tumors. The main part of this thesis also shows in details the origin and properties of the leukemic stem cells and describes some new directions in the targeted therapy of hematological malignancies.

**Keywords:** leukemic stem cells (LSCs), cancer stem cells (CSCs), hematopoietic stem cells (HSCs), progenitors, self-renewal, marker, tumor

## **Obsah**

<b>2. Úvod.....</b>	<b>6</b>
<b>3. Biologie kmenových buněk.....</b>	<b>7</b>
3.1 Definice a vlastnosti kmenových buněk.....	7
3.2 Identifikace kmenových buněk .....	11
3.3 Hematopoetické kmenové buňky .....	12
<b>4. Nádorové kmenové buňky .....</b>	<b>15</b>
4.1 Hypotéza existence nádorových kmenových buněk .....	15
4.2 Vlastnosti nádorových kmenových buněk .....	17
<b>5. Leukemické kmenové buňky .....</b>	<b>20</b>
5.1 Obecná charakteristika leukémií .....	20
5.2 Původ a vznik LSCs .....	21
5.3 Vlastnosti LSCs.....	24
<b>6. Nové strategie terapie založené na cílení nádorových kmenových buněk .....</b>	<b>25</b>
6.1 Cílení LSCs .....	25
<b>7. Závěr.....</b>	<b>28</b>
<b>8. Seznam zkratk .....</b>	<b>29</b>
<b>9. Použitá literatura.....</b>	<b>31</b>

## 2. Úvod

Nové poznatky v oblasti léčby nádorů jsou jedním z nejpopulárnějších témat biologického a biomedicínského výzkumu. S obrovským rozvojem metod zkoumání buněk nádorové masy přichází řada nových objevů, které výrazně přispívají protinádorové medicíně. Myšlenka, že nádory vznikají ze specifické populace početně omezených buněk, existuje už několik desetiletí. Avšak až začátkem devadesátých let se objevuje hypotéza existence tzv. nádorových kmenových buněk (CSC - cancer stem cells), což jsou buňky svým chováním a vlastnostmi velmi podobné normálním kmenovým buňkám. Je dokázáno, že CSCs udržují schopnost sebeobnovy, mají rozsáhlý replikační potenciál, jsou schopné tvořit ostatní (nekmenové) populace nádorových buněk a mnoho dalších vlastností, které sdílejí s normálními kmenovými buňkami. Ukazuje se tedy, že existence těchto kmenových buněk odpovídá na řadu neúspěchů v nádorové terapii, jako je relaps onemocnění způsobený rezistencí CSCs vůči terapiím.

Reakcí na tyto teorie vznikla celá řada prací zabývajících se specifickými vlastnostmi nádorových kmenových buněk převážně hematopoetického systému. Jelikož objevení CSCs bylo učiněno na případě akutní myeloidní leukémie, je nejvíce prací publikovaných na leukemických kmenových buňkách (LSCs - leukemic stem cells). Právě intenzivní vědecké výzkumy zabývající se LSCs přinesly mnoho nových poznatků, které mohou být prakticky využitelné. Ukazuje se, že LSCs jsou buňky odvozené buď z normálních hematopoetických kmenových buněk (HSCs - hematopoietic stem cells), nebo z jejich progenitorů. Jsou tedy normálním HSCs většinou velmi podobné a sdílejí s nimi řadu vlastností. Existuje však mnoho studií, které poukazují na rozdílné vlastnosti LSCs jako je například exprese jiných povrchových markerů např. CLL-1 nebo CD33. Dále LSCs mají deregulovanou celou řadu signálních drah, které jim napomáhají např. k udržení schopnosti sebeobnovy. Tyto i jiné další specifické vlastnosti slouží k testování celé řady léčiv, která by mohla být významná pro úspěšnou léčbu leukemie. Ovšem většina těchto nově vyvinutých terapií je buď teprve v počátcích vývoje, anebo je jejich účinnost stále omezená.

Cílem práce bylo zpracovat dostupnou literaturu a informace týkající se biologie kmenových buněk se zaměřením na nádorové a leukemické kmenové buňky. Uvést historické milníky v oboru výzkumu leukemických kmenových buněk a poukázat na novinky terapeutického využití těchto poznatků. A v neposlední řadě upozornit na sporné momenty ve výzkumu a využití nádorových respektive leukemických kmenových buněk.

### **3. Biologie kmenových buněk**

#### **3.1 Definice a vlastnosti kmenových buněk**

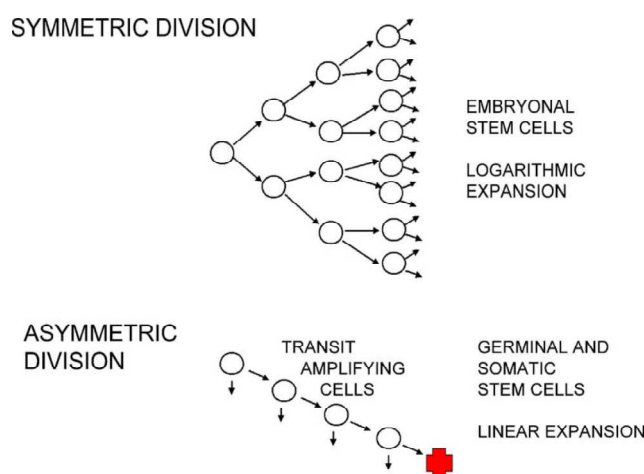
S objevem a především s možnostmi využití kmenových buněk (SCs – stem cells) v terapiích mnoha nevyléčitelných nebo těžce léčitelných chorob se kmenové buňky a jejich biologie dostaly do popředí zájmu mnoha významných biologických a biomedicínských výzkumných pracovišť. I přes obrovský pokrok výzkumu na poli biologie a mechanismů působení SCs jejich přesná definice dosud není ještě zcela jednoznačná.

Kmenové buňky byly definovány jako nediferencované buňky, které mají výraznou schopnost sebeobnovy, rozsáhlý replikační potenciál a jsou schopné diferencovat se do mnoha buněčných typů (Reya et al., 2001). Podle Soltysové a spol. lze kmenové buňky rozdělit na tři hlavní skupiny: embryonální kmenové buňky, zárodečné kmenové buňky a somatické kmenové buňky (Soltysova et al., 2005).

Embryonální kmenové buňky (ESCs) zastávají klíčovou roli v ontogenezi mnohobuněčných organismů. Jsou odvozeny z prvních pěti či šesti dělení oplozeného vajíčka tj. z blastocysty (Sell, 2004). Jedná se o buňky pocházející z embryoblastu (vnitřní buněčné masy blastocysty) a dají se považovat za buňky omnipotentní, což jsou buňky schopné diferencovat se do všech zárodečných vrstev (ektodermu, entodermu a mezodermu). Dalším znakem je vysoká aktivita enzymu telomerázy, která jim dává téměř neomezený replikační potenciál (Soltysová et al., 2005). Zárodečné kmenové buňky jsou odvozeny od primární germinativní vrstvy embrya a diferencují se na progenitory produkující specifické orgánové buňky. V dospělém organismu jsou také zodpovědné za produkci vajíček a spermií. Somatické kmenové buňky (SSCs) jsou považovány za buňky progenitorové, protože jsou méně omnipotentní a mají výrazně nižší replikační potenciál než ESCs. Jako důkaz můžeme považovat to, že vykazují výrazně nižší aktivitu telomerázy než právě ESCs. SSCs lze identifikovat ve většině tkání dospělého organismu, převážně pak v tkáních hematopoetických, neurálních, gastrointestinálních a mezenchymálních (Sagar et al., 2007). V hematopoetické tkáni se jedná o multipotentní SSCs, což znamená, že se mohou diferencovat do všech krevních řad. Dalším typem SSCs jsou buňky unipotentní, které jsou schopné se diferencovat pouze do jednoho typu buněk. Nejznámějším příkladem unipotentních buněk jsou spermatogonie (Keith, 2004).

V nedávné době byl popsán i další typ kmenových buněk a to jsou tzv. indukované pluripotentní kmenové buňky. Studie Takahashiho a Yamanaky ukazuje, že pomocí čtyř transkripčních faktorů (Oct4, Sox2, Klf4 a cMyc) lze konvertovat diferencované somatické buňky (např. fibroblasty) na pluripotentní diferenciační stádia, která jsou téměř shodná s embryonálními kmenovými buňkami (Takahashi & Yamanaka, 2006).

Jak bylo řečeno výše, kmenové buňky jsou dlouhodobě v popředí zájmu mnoha výzkumných pracovišť po celém světě. Proto jsou jejich vlastnosti poměrně dobře prozkoumané. Jednou ze základních vlastností SCs je schopnost sebeobnovy a neomezený replikační potenciál především u ESCs. Schopnost sebeobnovy je odvozena z typů buněčného dělení kmenových buněk. SCs se mohou dělit buď symetricky, přičemž každá dceřiná buňka si zachovává vlastnosti rodičovských buněk, nebo asymetricky, kde si jedna dceřiná buňka zachovává vlastnosti rodičovských kmenových buněk, zatímco druhá postupuje proces determinace (zadání), (viz Obr. 1). Ukazuje se tedy, že schopnost asymetrického dělení je jedním z klíčových znaků kmenových buněk. Symetricky se dělí hlavně ESCs, kde každá dceřiná buňka zůstává buňkou totipotentní, což vede k logaritmické expanzi ESCs během embryonálního růstu. Poté, jak se začnou formovat zárodečné vrstvy embrya a začíná proces determinace, se kmenové buňky začínají dělit asymetricky. Vznikají tedy dceřiné progenitorové buňky, které se mohou diferencovat do dalších buněčných linií. Progenitorové buňky si nadále zachovávají schopnost se dělit a dále diferencovat do několika dalších stádií a přispívají k obnově dospělých tkání. Tyto buňky jsou známy například jako progenitorové buňky v kostní dřeni. Konečným diferenciačním stádiem progenitorových buněk z kostní dřene jsou zralé krevní komponenty např. erytrocyty a leukocyty - granulocyty, monocyty, lymfocyty, trombocyty (Sherley, 2002).



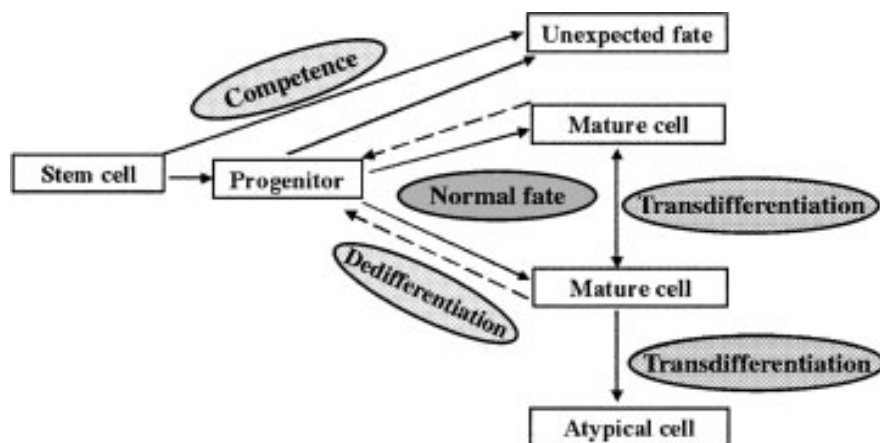
Obr. 1: Symetrické a asymetrické dělení SCs (Sell, 2004)



Mezi další významné znaky SCc patří jejich replikační potenciál. Ten je nejspíše závislý na aktivitě enzymu telomerázy, která prodlužuje telomery (konce chromozomů) při buněčném dělení. Proto nejvyšší replikační potenciál vykazují ESCs. Je však dokázáno, že aktivita telomerázy klesá při stárnutí organismu, proto je replikační potenciál adultních SSCs nižší (Wright et al., 1996). Výjimku však tvoří hematopoetické kmenové buňky, které si zachovávají nízkou hladinu aktivní telomerázy a vykazují tedy poměrně vysoký replikační potenciál i přes to, že se jedná již o buňky diferencované (Magnus et al., 2008).

Udržování pluripotence kmenových buněk (převážně embryonálních) patří také do základních vlastností SCs. Prvotně byly mechanismy udržování pluripotence a diferenciacie studovány na myších modelech. Bylo dokázáno, že za inhibici diferenciacie, která je zodpovědná za udržení pluripotence, je odpovědný LIF (leukemia inhibitory faktor) a BMP (bone morphogenetic protein) pomocí transkripční dráhy JAK - STAT (Trousseau, 2004). U lidských embryonálních SCs (hESCs) se předpokládalo shodné působení LIF jako u myší. Ale podle Pera a spol. je udržování pluripotence hESCs na LIF nezávislé. Ukazuje se, že je za to odpovědný BMP-2 faktor (bone morphogenetic protein 2), jehož antagonistou je noggin, který dokáže způsobit příslušnou diferenciaci ESCs (Pera et al., 2004).

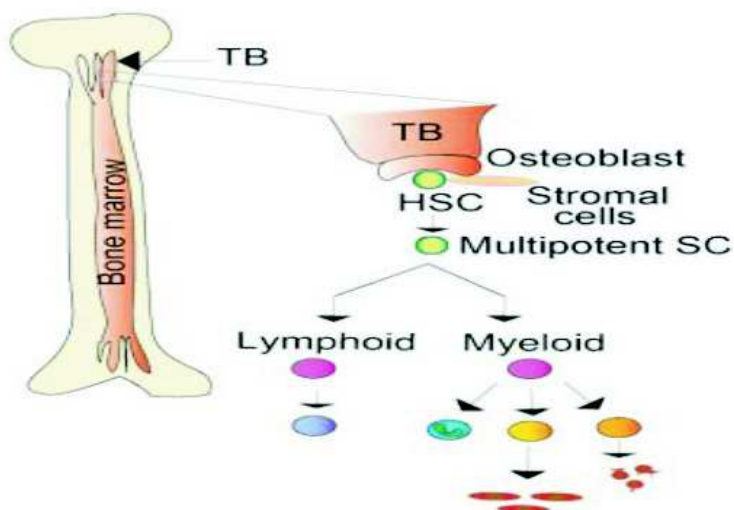
Další velmi významnou vlastností převážně adultních kmenových buněk je jejich plasticita. Ta umožňuje diferenciaci již tkáňově specifických SCs na buňky jiných buněčných typů. To může nastat prostřednictvím tří různých mechanismů: transdiferenciacie, diferenciacie a dediferenciacie (Liu & Rao, 2003). Pokud dojde ke konverzi buněk z jedné tkáňové linie do zcela odlišné tkáňové linie, mluvíme o procesu transdiferenciacie, který je dále provázen ztrátou specifických markerů dané linie a získáním markerů nových. Dediferenciacie je proces konverze zralých kmenových buněk zpět na progenitory (viz Obr. 2).



Obr. 2: Transdiferenciace, dediferenciace a diferenciacie SCs (Liu & Rao, 2003).

Potenciál kmenových buněk v regenerativní medicíně závisí na jejich vyjmutí z jejich přirozeného prostředí, množení v umělých kulturách a jejich umístění do prostředí cizí tkáně. Aby to bylo možné, je nezbytné porozumět tomu, jak SCs interagují s jejich mikroprostředím a jak toto prostředí ovlivňuje jejich přirozené vlastnosti. Výsledky mnoha studií ukazují, že význam speciálního mikroprostředí má zásadní postavení v určování vlastností a řízení SCs (Fuchs et al., 2004). Speciální mikroprostředí bylo nazváno „niche“ a bylo definováno jako místo s SCs a souborem diferencovaných buněčných typů, které specificky ovlivňují právě vlastnosti kmenových buněk, jako např. schopnost sebeobnovy a diferenciaci (Schofield, 1978).

Jako příklad „niche“ kmenových buněk si můžeme uvést mikroprostředí spojené s hematopoetickými kmenovými buňkami (HSCs). Kost a kostní dřev jsou svým způsobem spojené s HSCs a jejich progenitory jsou umístěny proximálně na povrchu trabekulární kosti (TB). Vědecké studie ukázaly, že poloha HSCs je plně závislá na osteoblastech (viz Obr. 3). Důkazem může být rapidní nárůst počtu HSCs při laboratorním zvýšení počtu právě osteoblastů. Výsledky studií naznačují, že HSCs jsou pomocí adherentního komplexu N-cadherin/ $\beta$ -catenin drženy na osteoblastech, což brání jejich diferenciaci. Negativním regulátorem adherentního komplexu N-cadherin/ $\beta$ -catenin je c-Myc transkripční faktor, který je aktivní právě v diferencujících se HSCs. Dalším důkazem, že „niche“ ovlivňuje vlastnosti HSCs, je exprese ligandů pro Notch a Wnt v osteoblastech. Notch a Wnt signální dráhy vedou kmenové buňky k proliferaci. Notch signální dráha vede k inhibici diferenciaci, což vyvolává Wnt indukovanou proliferaci (Moor & Lemischka, 2006). Je tedy patrné, že fyzické interakce mezi HSCs a jejich „niche“ jsou naprosto zásadní. Další faktory, které se na těchto interakcích podílejí, jsou integriny a cadheriny. Tyto malé povrchové molekuly (např. integriny VLA-4, VLA-5) jsou účinnými aktivátory malých GTPáz rodiny Rac-1 a Rac-2. Delece obou těchto GTPáz způsobí masivní odtok HSCs do krevního řečiště (Gu et al., 2003).



Obr. 3: Uložení HSCs v kostní dřeni (Fuchs et al., 2004)

### 3.2 Identifikace kmenových buněk

Způsob, jakým se dají kmenové buňky identifikovat v „in vitro“ a „in vivo“ kulturách, je aktuální téma, kterým se zabývá mnoho výzkumných laboratoří po celém světě. Nejčastější metodou identifikace je zjišťování exprese povrchových markerů SCs např. epiteliálních kmenových buněk prsní tkáně nebo kmenových buněk mozku. V prvním případě po řadě transplantačních pokusů na myších prsních tkáních byly zjištěny jednotlivé povrchové markery, které charakterizují různé typy buněčných populací. Hlavním povrchovým markerem epiteliálních kmenových buněk byl zjištěn CD24. Nepřítomnost tohoto markeru (tedy CD24<sup>-</sup>) charakterizuje buňky, které nejsou epiteliálního původu. Nízká exprese CD24 se vyskytovala na bazálních myoepiteliálních buňkách a vysoká exprese na luminálních epiteliálních buňkách (Lynch et al., 2006).

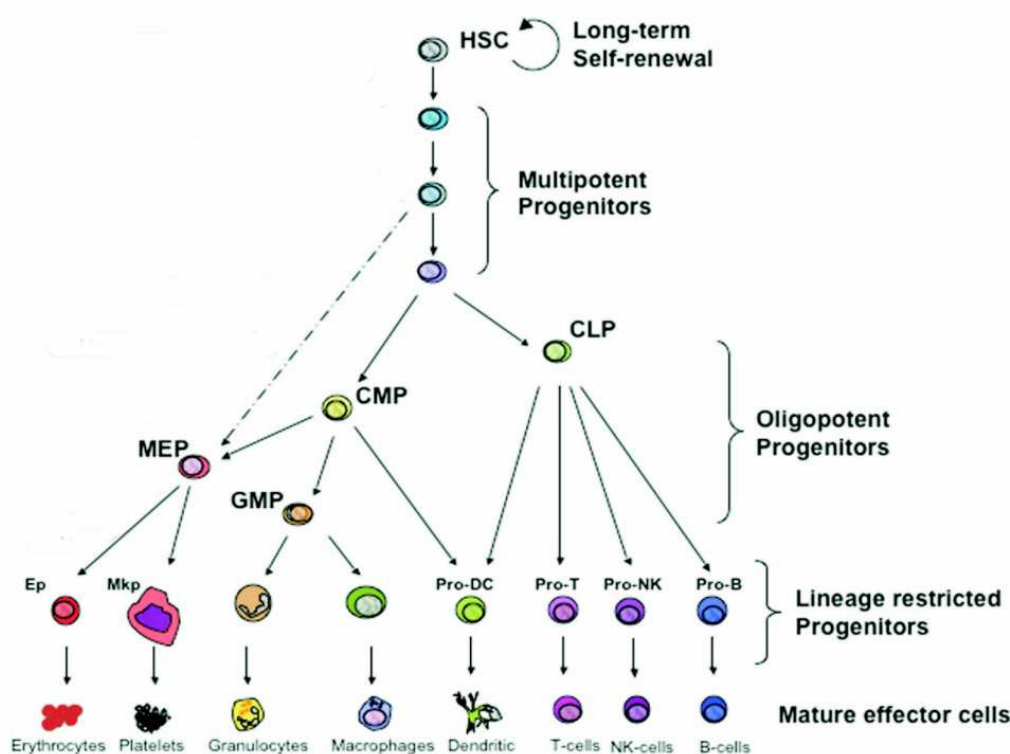
Další metodou pro identifikaci kmenových buněk je rozpoznání tzv. SP (side population) buněk. SP buňky vykazují vysokou expresi transmembránových přenašečů typu ABC (ATP-binding cassette), které slouží mimo jiné k odstraňování cizorodých látek z buněk. Výzkum tohoto fenoménu byl prováděn na barvivech typu Hoechst, která byla účinně odstraňována z buněk a ty pak zůstaly neobarvené. S expresí ABC přenašečů je spojena výrazná odolnost buněk proti cytotoxickým látkám, což umožňuje jejich ochranu DNA. Jelikož se SP fenotyp vyskytuje především u kmenových buněk, stal se tak důležitým znakem pro jejich identifikaci (Trobepe et al., 1999).

Kmenové buňky mohou být identifikovány také na základě tvorby specifických buněčných kolonií. Příkladem jsou SCs mozku, které za přítomnosti růstových faktorů EGF (epidermal growth factor) a FGF (fibroblast growth factor) tvoří tzv. neurosféry. Jedná se o kolonie kmenových a progenitorových buněk (Trobepe et al., 1999).

### **3.3 Hematopoetické kmenové buňky**

Alexander A. Maximow působící jako vojenský lékař v Petrohradě si již roku 1909 všiml, že v krvi existují krvetvorné buňky, které jsou velmi podobné lymfocytům. Zjistil také, že se tyto specializované buňky nacházejí ve zvláštním prostředí, které jim napomáhá k proliferaci a diferenciaci. Později, roku 1924, publikoval všechny své poznatky ve „Physiological Revue“ (Maximow, 1924). Avšak v mnoha vědeckých publikacích jsou za popsání hematopoetických kmenových buněk citováni J. E. Till a E. A. McCulloch, kteří zkoumali proliferační kapacitu buněk kostní dřeně na základě radiační citlivosti. Zjistili, že v kostní dřeni jsou buňky s velmi vysokou proliferační kapacitou. Tyto buňky pak nazvali hematopoetické kmenové buňky (Till & McCulloch, 1961). Hematopoetické kmenové buňky mají obrovskou regenerační kapacitu a jsou schopny nahrazovat téměř veškeré odumírající krevní buňky. HSCs mají zároveň potenciál se diferencovat do dvou linií krevních progenitorů: lymfoidních (CLP - common lymphoid progenitor), které zahrnují B lymfocyty, T lymfocyty, NK buňky (natural killers) a lymfoidní dendritické buňky, a myeloidních (CMP - common myeloid progenitor), které zahrnují granulocytové/makrofágové progenitory (GMP) a megakaryocytové/erytrocytové progenitory (MEP), (viz Obr. 4).

## Hematopoietic Hierarchy



Obr. 4: Diferenciace HSCs (Weissman & Shizuru, 2008)

O původu HSCs je dokázáno, že společně s časnými lymfoidními (erytroidními) a myeloidními progenitory (EMPs) se diferencují ze zřetelné populace endoteliálních buněk. „In vitro“ mohou být EMPs generovány buď z embryonálních nebo z indukovaných kmenových buněk, ale pokusy o získání čistých HSCs zatím selhávají (Chen et al., 2011).

HSCs jsou jedny z nejprobádanějších kmenových buněk a bylo na nich učiněno mnoho objevů, včetně objevu leukemických a nádorových kmenových buněk. Jedním z důvodů tohoto fenoménu je fakt, že HSCs mají mnoho vlastností, které výrazně usnadňují jejich transplantaci na rozdíl od ostatních kmenových buněk. Je možné je snadno vyjmout z jejich přirozeného mikroprostředí a injikovat je do krevního oběhu příjemce, kde si zachovávají svůj HSC potenciál. Znovu se dostanou do jejich přirozených „niche“ a obnovují své funkce v regeneraci hematopoetických tkání. Tato flexibilita zřejmě pramení z jejich obvyklého migračního chování, kdy často opouštějí svá „niche“ do krevního řečiště a migrují na zcela odlišná místa (Schroeder, 2010, Till et al., 1964). Tyto vlastnosti by mohly vést k myšlence, že HSCs jsou poměrně početně zastoupené v hematopoetických tkáních. Pravdou však je, že jsou velmi vzácné a pouze jedna tisícinu hematopoetických buněk jsou buňky kmenové. Jediný způsob jak prokázat HSC potenciál u buněk je test během transplantace.

Velkým problémem je fakt, že testovaná kmenová buňka je během testu dávno diferencovaná a pro další analýzu jsou dostupné pouze její progenitory. Řešením tohoto problému je identifikace molekulárních markerů, které jsou pro HSCs specifické a umožňují jejich identifikaci (Schroeder, 2010).

Přesnou identifikaci HSCs pomocí povrchových markerů se stále zabývá mnoho vědeckých pracovišť. Problémem však stále zůstává, že zatím nebyla nalezena žádná spolehlivá charakteristika, která by HSCs odlišovala. Jak už bylo řečeno výše, nejvíce úsilí bylo vynaloženo na objevení specifického povrchového antigenu. Takovýchto povrchových markerů byla objevena celá řada. Prvním objeveným markerem vyskytujícím se na HSCs a progenitorech byl CD34 (My-10). Autoři Civin a spol. pomocí myší monoklonální protilátky anti-My-10 ukázali, že CD34 je specificky exprimován na lidských buňkách kostní dřeně včetně hematopoetických progenitorů (Civin et al., 1984). Později se však prokázalo, že mohou existovat i HSCs, které jsou CD34 negativní, ale tyto buňky jsou velmi vzácné (Bhatia et al., 1998). V roce 1992 Baum a spol. identifikovali další povrchový marker a to CD90 (Thy1). V kombinaci s CD34 vymezuje malou populaci  $CD34^{+} THy1^{+}$  buněk, které mají multilineární kapacitu (Baum et al., 1992). Pozdější studie představují CD45RA a CD38 jako další povrchové antigeny, které ale nebyly prokázány na HSCs, ale pouze na jejich diferencovaných progenitorech (Bhatia et al., 1997, Lansdorp et al., 1990). Dalším velmi slibným povrchovým markerem je CD133, který byl nalezen jak na HSCs, tak i na jejich progenitorech. Avšak tento marker se vyskytuje také na celé řadě ne-hematopoetických tkání (Bhatia, 2001). Dobrým povrchovým markerem se zdá také být CD123 (IL – 3  $\alpha$  řetězec), který se vyskytuje i na maligních HSCs (Muñoz et al., 2001). Mezi povrchové molekuly použitelné pro identifikaci kmenových buněk patří také integriny. Na HSCs byl objeven integrin  $\alpha 2$  (CD49b) a integrin  $\alpha 6$  (CD49f), přičemž CD49b se vyskytuje pouze u myší (Doulatov et al., 2012). Jako další marker, vyskytující se pouze na myších, byl objeven CD150, který je exprimován na HSCs (Larochelle et al., 2011). Povrchový marker CD117 (c-Kit) byl také objeven jako antigen na HSCs, avšak je prokázán také na melanocytech a střevních buňkách (Sarlomo-Rikala et al., 1998). Hosen a spol. prokázali ve své práci CD96 jako marker hematopoetických tkání, který se zdá být specifický i pro leukemické kmenové buňky. Ale i tento povrchový faktor se vyskytuje také v celé řadě jiných tkání např. v ledvinovém či střevním epitelu (Hosen et al., 2007). Mezi povrchové markery lze také zařadit KDR receptor, který značí některé pluripotentní HSCs (Ziegler et al., 1999). Brekelmans a spol. identifikovali transferinový receptor (CD71) jako jeden z faktorů

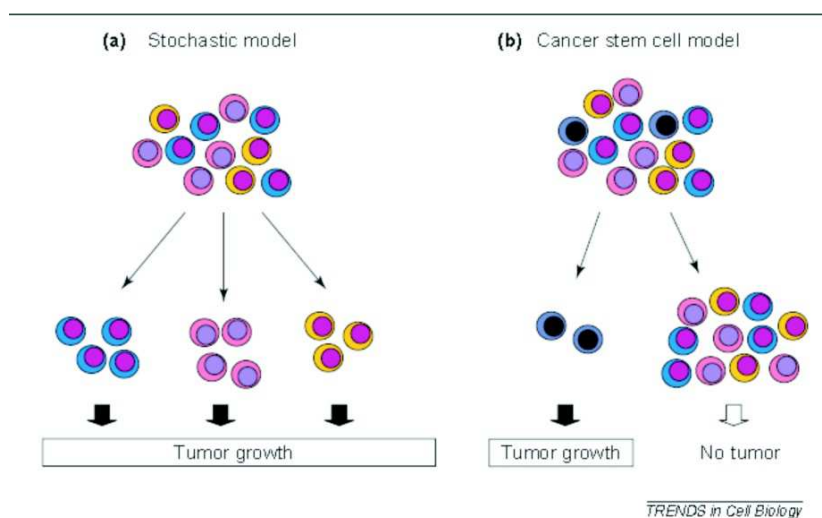
vyskytujících se jak na HSCs, tak i na časných progenitorech např. na nezralých thymocytech (Brekelmans et al., 1994).

Další metodou identifikace HSCs je již zmiňovaná SP metoda (viz 3.2). U HSCs se konkrétně využívá fluorescenční barva Hoechst 33342 (Goodell et al., 1997). Identifikace HSCs je také možná použitím aldehyd dehydrogenázy (ALDH), což je cytosolický enzym, který je zodpovědný za oxidaci intracelulárního aldehydu. Zvýšené hladiny ALDH byly pozorovány v myších a lidských progenitorových buňkách a porovnány s ostatními HSCs (Jones et al., 1995).

## **4. Nádorové kmenové buňky**

### **4.1 Hypotéza existence nádorových kmenových buněk**

Rakovina je charakterizována nadměrným a nekontrolovatelným růstem abnormálních buněk, které mohou napadat (invadovat) a zničit okolní tkáň. Z tohoto popisu můžeme vyvodit, že všechny rakovinné buňky jsou shodné, a proto mají schopnost iniciace a udržení nádoru. Nicméně už dlouhou dobu je známo, že zhoubné buňky v jednom nádoru disponují morfologickou, proliferační a funkční heterogenitou. V současnosti existují dva modely, které vysvětlují heterogenitu nádorových buněk: stochastický a hierarchický. Oba modely předpokládají, že pouze malá frakce nádorových buněk má schopnost zahájit a udržet růst nádoru. Stochastický model předpokládá, že všechny buňky obsažené v nádoru jsou biologicky homogenní a jsou schopné regenerovat celý nádor. Avšak pro iniciaci nádoru jsou důležité další faktory a to buď vnitřní, což je např. určitá hladina specifického transkripčního faktoru, nebo vnější, mezi které patří např. typ mikroprostředí nebo imunitní odpověď. Naproti tomu hierarchický model (také model nádorových kmenových buněk) předpokládá, že pouze podmnožina nádorových buněk (nádorové kmenové buňky) má schopnost obnovit nádorovou masu (Reya et al., 2001), (viz Obr. 5).



Obr. 5: Hypotézy heterogenity nádorových buněk (Wang & Dick, 2005)

Hypotéza nádorových kmenových buněk (CSCs) vychází ze skutečnosti, že nádory jsou poškozené, neregulovatelné tkáňové klony, jejichž další šíření je závislé na biologicky odlišných podskupinách buněk, které jsou obvykle vzácné (Nguyen et al., 2012). Samotný důkaz, že nádory skutečně obsahují podskupiny nediferencovaných buněk, byl definitivně popsán roku 1997 na příkladu akutní myeloidní leukémie (AML) na NOD/SCID (non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency disease) myších. U zjištěné subpopulace buněk byly popsány povrchové markery  $CD34^{+} CD38^{-}$ , což je fenotyp shodný s normálními HSCs nebo s jejich časnými progenitory. Z toho můžeme vyvodit, že CSCs vznikají buď přímo z původních kmenových buněk, v tomto případě z hematopoetických, nebo z málo diferencovaných progenitorů (Bonnet & Dick, 1997). Později se tato teorie rozšířila i na nádory ostatních tkání a byly izolovány buňky s podobnými vlastnostmi jako u AML. Po sériích pokusů na ostatních tkáních se formuje definice CSCs jako buněk se schopností sebeobnovy a diferenciace na všechny buněčné linie, které tvoří hlavní složku daného nádoru (Dick, 2008).

Získat důkazy o existenci CSCs u nádorů pevných tkání bylo mnohem obtížnější než v případě nádorových buněk hematopoetické tkáně. Důvodem může být to, že buňky v rámci pevných nádorů jsou méně přístupné a metody pro jejich identifikaci a izolaci nejsou tak dobře prostudovány jako u HSCs. Ukazuje se tedy, že nádor pevných tkání může být definován jako tkáňový systém, v němž existují některé buňky s velmi pomalým buněčným cyklem (CSCs), které indukují jak vznik celé buněčné masy nádoru pomocí intenzivní diferenciace a proliferace, tak i další CSCs a dokonce i netumorigenizující kmenové buňky.

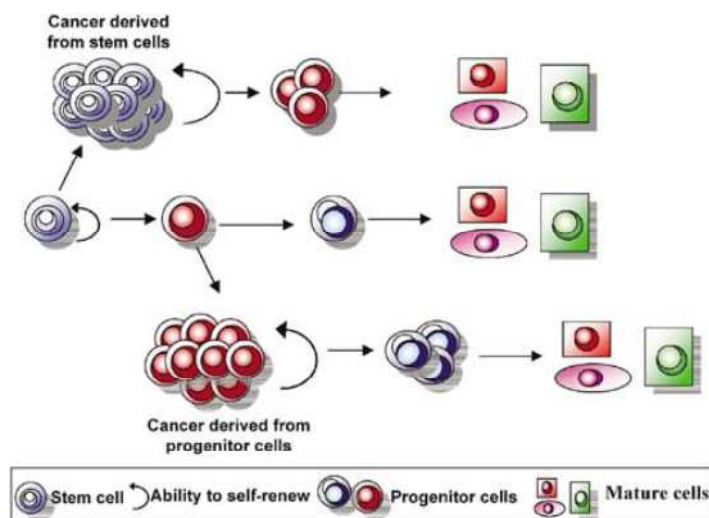


Je však dokázáno, že pozdní diferenciační stádia CSCs nemají buď žádnou, nebo velmi sníženou schopnost tvořit nové nádory. Tyto poznatky mají velký význam pro výzkum formování nádorů, stejně jako pro diagnostiku a léčbu rakoviny. K efektivní léčbě rakoviny musí být kompletně odstraněny CSCs. Pokud léčba plně nezasáhne kmenové buňky, ale např. pouze diferencované netumorigení progenitory, nádor se znovu velmi rychle obnoví (Al-Hajj & Clarke, 2004, Al-Hajj et al., 2003).

Jako se struktura normálních buněčných tkání skládá z pluripotentních SCs, jejich progenitorů a plně diferencovaných buněk, i buněčná masa nádoru obsahuje tytéž typy buněk. Nabízí se tedy otázka, v jaké fázi dochází k nahromadění mutací pro vznik kompletních CSCs? Jelikož mutace vzniklé na diferencovaných progenitorech většinou nevydrží dlouho, protože dané progenitory jsou často krátkověké a postrádají schopnost sebeobnovy, nejvíce mutací vzniká již na pluripotentních kmenových buňkách. Existují však i poměrně významné výjimky, jako např. AML M3 (akutní promyelocytární) leukémie, kde CSCs vznikají z progenitoru a další mutací získávají schopnost sebeobnovy (Al-Hajj & Clarke, 2004).

#### **4.2 Vlastnosti nádorových kmenových buněk**

Základní a nejdůležitější vlastností CSCs pro nádorovou terapii je bezesporu jejich schopnost sebeobnovy, která je definovaná jako unikátní buněčné dělení, ve kterém schopnost progenitorů se množit a diferencovat je stejná jako u rodičovských buněk (více viz 3.1). Za regulaci sebeobnovy u normálních kmenových buněk je odpovědná řada genů např. Bmi-1, Notch a Wnt. Všechny tyto geny byly nalezeny také v nádorových kmenových buňkách a hrají nezastupitelné role ve formování nádorové masy. Například Bmi-1 (člen Polycomb genové rodiny) je v myších modelech leukémie nezbytný pro sebeobnovu u LIC (leukemia initiating cells) buněk (Lessard & Sauvageau, 2003). Je tedy zřejmé, že CSCs odvozené z progenitorových buněk vyžadují specifickou mutaci, která by reaktivovala dráhy důležité pro jejich schopnost sebeobnovy. Naproti tomu CSCs odvozené z normálních kmenových buněk už mají tuto schopnost aktivovanou (viz Obr. 6).



Obr. 6: Původ CSCs a jejich schopnost sebeobnovy (Al-Hajj & Clarke, 2004)

K zásadním vlastnostem CSCs patří exprese jejich povrchových markerů. Z hlediska klinického využití se jedná o velmi důležitou vlastnost, která umožňuje identifikovat a izolovat CSCs. Z nádorů pevných tkání, po identifikaci kmenových buněk z AML (viz 5.2), byly jako první identifikovány povrchové markery na buňkách rakoviny prsní tkáně. Podobně jako u AML i tento výzkum byl prováděn na NON/SCID myších, kde byly izolovány  $CD44^+CD24^-$  CSCs. Ukazuje se tedy, že právě CD44 by mohl být povrchovým markerem u kmenových buněk nádorů prsní tkáně (Al-Hajj et al., 2003). Jako další byly identifikovány povrchové markery na buňkách nádoru mozku, kde byl jako hlavní povrchový marker objeven CD133 (Singh et al., 2004). Tento povrchový antigen byl však původně identifikován jako marker u  $CD34^+$  hematopoetických a neurálních kmenových buněk (viz 3.3). CD133 byl také prokázán jako marker u nádorových buněk rakoviny tlustého střeva (O'Brien et al., 2006) a později identifikován i u rakoviny slinivky. Na rakovině slinivky byl kromě CD133 popsán jako povrchový marker ještě CXCR4 (Hermann et al., 2007). V dalších studiích se ukázalo, že CD133 se vyskytuje i na nádorových buňkách plicní tkáně (Eramo et al., 2007). Také po identifikaci CD44 na nádorových kmenových buňkách prsní tkáně se vyskytlo mnoho prací prezentujících tento povrchový antigen i na jiných nádorových tkáních. CD44 byl společně s faktorem EpCAM nalezen na CSCs rakoviny tlustého střeva (Dalerba et al., 2007) a také na rakovině slinivky, kde byly identifikovány  $ESA^+CD44^+CD24^+$  buňky (Li et al., 2007). Poslední objev  $CD44^+$  buněk byl učiněn na spinocelulárním karcinomu hlavy a krku (Prince et al., 2007). Důkazy, že se skutečně jedná o nádorové kmenové buňky, jsou zřetelné z několika prací, které se zabývaly schopností sebeobnovy u  $CD44^+$  buněk. Princ a spol. identifikovali na  $CD44^+$  buňkách expresi Bmi-1 (viz výše) a Li a spol. na  $ESA^+CD44^+CD24^+$

buňkách expresi hedgehog genů (Prince et al., 2007, Li et al., 2007). Dráhy těchto genů jsou také odpovědné za schopnost sebeobnovy CSCs a jsou přítomny jako časné mediátory vzniku rakoviny slinivky břišní (Thayer et al., 2003).

Pro identifikaci normálních kmenových buněk se používají další metody, které jsou odlišné od povrchových markerů a to identifikace SP buněk a aktivita ALDH (viz 3.3). Stejně metody mohou být použity i pro identifikaci některých CSCs. Wu a spol. studovali SP<sup>+</sup> a SP<sup>-</sup> buňky v primárních svalových a kosterních nádorech v rozmezí od benigních až po velmi zhoubné a ukázali, že schopnost iniciovat nádor existuje pouze v SP<sup>+</sup> populaci buněk. Nádory vzniklé z SP<sup>+</sup> buněk vykazovaly schopnost sebeobnovy a podobnosti s rodičovskými nádorovými buňkami, ze kterých byly odvozeny. Autoři zkoumali také korelaci SP<sup>+</sup> buněk s agresivitou nádorů a přišli na to, že čím více SP<sup>+</sup> buněk se v nádorové masě nachází, tím je nádor agresivnější (Wu et al., 2007). Někteří autoři místo SP<sup>+</sup> buněk sledovali přímo expresi ABC přenašečů (konkrétně ABCB5) na buňkách melanomů a zjistili, že ABCB5<sup>+</sup> buňky jsou schopné iniciovat melanom a mají schopnost sebeobnovy (Schatten et al., 2008). Aktivita ALDH byla zkoumána v závislosti na odolnosti nádorových buněk proti chemoterapiím. Byla zjištěna zvýšená aktivita ALDH1 na CD44<sup>+</sup> buňkách rakoviny tlustého střeva (Dylla et al., 2008) a později i na nádorových buňkách rakoviny prsu (Sladek et al., 2002), (viz Obr. 7).

Markers Used to Enrich for Solid Tumor CSCs		
CD133	Brain	(CD133 <sup>+</sup> )
	Colon	(CD133 <sup>+</sup> )
	Pancreas	(CD133 <sup>+</sup> )
	Lung	(CD133 <sup>+</sup> )
CD44	Breast	(CD44 <sup>+</sup> CD24 <sup>-</sup> )
	Head and neck	(CD44 <sup>+</sup> )
	Colon	(CD44 <sup>+</sup> EpCAM <sup>+</sup> )
	Pancreas	(CD44 <sup>+</sup> CD24 <sup>+</sup> ESA <sup>+</sup> )
CD90	Hepatocellular	(CD90 <sup>+</sup> )
ABC proteins	Melanoma	(ABCB5 <sup>+</sup> )
Functional markers		
Side Population	Mesenchymal	(SP <sup>+</sup> )
ALDH	Breast	(ALDH <sup>+</sup> )
	Colon	(CD44 <sup>+</sup> EpCAM <sup>+</sup> ALDH1 <sup>+</sup> )

Obr. 7: Markery exprimované na nádorech pevných tkání (O'Brien et al., 2009)

Z mnoha studií normálních kmenových buněk vyplývá, že mikroprostředí, ve kterém se dané buňky nacházejí, zastává klíčovou roli ve fungování SCs (viz 3.1). Zjistilo se, že i pro růst nádorových kmenových buněk je zásadní, v jakém prostředí se vyskytují. Proto byla

teorie buněčné „niche“ publikována i na CSCs a ukázalo se, že i zde „niche“ zastává velmi důležité role ve formování nádorové masy. Za hlavní funkci nádorové „niche“ je považována regulace schopnosti sebeobnovy prostřednictvím mezibuněčných spojů s ostatními buňkami nádorové masy. Je prokázáno, že buněčná masa nádoru obsahuje např. fibroblasty, endoteliální buňky či buňky zánětu, které sekretují určité faktory přímo ovlivňující CSCs (Ailles & Weissman, 2007). Jedním ze známých faktorů je Gremlin 1, který působí jako antagonist BMP (viz 3.1), čímž udržuje CSCs v nediferencovaném stavu (Sneddon et al., 2006).

## **5. Leukemické kmenové buňky**

### **5.1 Obecná charakteristika leukémií**

Pojem leukémie dnes zahrnuje celou řadu maligních onemocnění postihujících hematopoetický systém. Ve své podstatě se jedná o onemocnění způsobené nadprodukcí ještě nezralých nebo plně diferencovaných leukocytů. Základní dělení leukémií je podle hematopoetické řady leukocytů, ze které jsou odvozeny. Proto rozlišujeme tzv. myeloidní řadu leukémií, která zahrnuje granulocyty, monocyty, erytrocyty a megakaryocyty, a lymfoidní řadu leukémií zahrnující B a T lymfocyty a NK buňky. Dále se dají leukémie dělit na akutní, které obsahují nezralé progenitorové buňky buď bez liniové příslušnosti, nebo již liniově determinované, a chronické, které jsou charakterizovány již zralými krevními buňkami (Misaghian et al., 2009). Toto rozdělení však neplatí absolutně, existují výjimky, např. leukémie z plazmatických buněk.

Nejčastějším a nejvíce prozkoumaným typem akutních leukémií je akutní myeloidní leukémie (AML), která je klasifikována do osmi FAB (French-American-British) subtypů podle zralosti, exprese povrchových molekul a morfologie leukemických blastů. AML-M0 tzv. časná myeloidní leukémie byla doplněná do sedmi původních FAB subtypů až v roce 1990 a prokazuje se buňkami s minimálními známkami myeloidní diferenciace. AML-M1 a M2 jsou velmi podobné typy myeloidní leukémie, které se od sebe liší pouze vyšší zralostí některých linií. AML-M3 (akutní promyelocytární leukémie) je charakteristická nádorovými elementy s rozštěpeným jádrem. Další dva typy M4 a M5 (myelomonocytární a monocytární leukémie) se od sebe liší zastoupením různých linií buněk. Zatímco AML-M4 obsahuje jak granulocytární, tak i monocytární řadu, AML-M5 obsahuje pouze monocytární řadu. Poslední

dva typy AML podle FAB členění jsou AML-M6 (erytroleukémie) a AML-M7 (megakaryoblastická leukémie) charakterizované proliferací erytroblastů v případě M6 a megakaryoblastů v případě M7 (Bennet et al., 1985, Harris et al., 1999). Dalším typem akutní leukémie je akutní lymfoidní (lymfoblastická) leukémie (ALL), která je rozčleněna do tří typů. ALL-L1, která obsahuje malé uniformní buňky a vyskytuje se nejčastěji u dětí, ALL-L2, která má velké odlišné buňky a ALL-L3 s velkými heterogenními buňkami obsahující vakuoly (Misaghian et al., 2009).

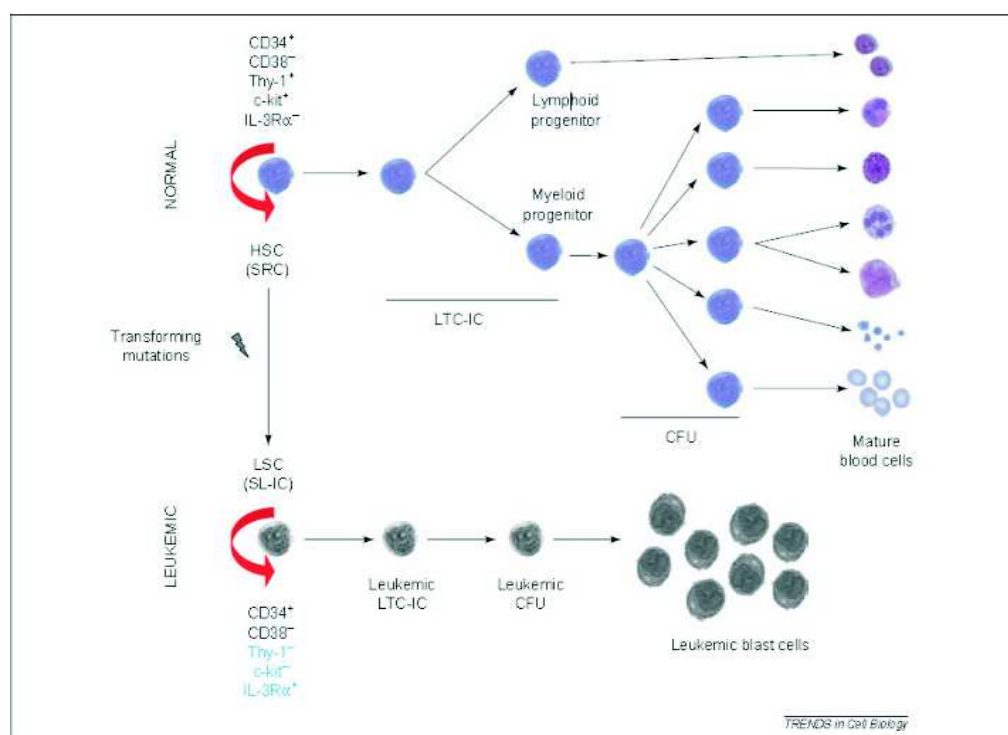
Nejvíce prozkoumanou chronickou leukémií je chronická myeloidní leukémie (CML). CML je charakterizována vysokou produkcí zralých myeloidních buněk. V průběhu onemocnění můžeme rozlišit tři stádia: chronickou fázi (CP), akutní fázi (AP) a tzv. blastickou krizi (BC), která je fenotypově podobná AML. I v případě chronických leukémií můžeme nalézt onemocnění vycházející z lymfatické řady. Příkladem je chronická lymfatická leukémie (CLL), která je nejčastějším leukemickým onemocněním západního světa. Obvykle je charakterizována nadprodukcí B-lymfoidních nebo výjimečně i T-lymfoidních buněk (Misaghian et al., 2009).

## **5.2 Původ a vznik LSCs**

Jak už bylo řečeno (viz. 4.1), objev leukemických kmenových buněk (LSCs) souvisí s rozvojem xenograftových modelů pro zkoumání nádorových buněk. V oblasti objevu LSCs byly použity tzv. NOD-SCID myší modely, kterým byly transplantovány leukemické buňky z kostní dřeně a periferní krve od pacientů s AML. Ve výsledku se ukázalo, že buňky schopné iniciovat leukémii tzv. SCID leukemia-initiating cells (SL-IC) vykazují schopnosti diferenciací a proliferace a mají potenciál sebeobnovy, který je prakticky shodný s normálními HSCs. U SL-IC buněk byl také prokázán  $CD34^{+}CD38^{-}$  fenotyp, který je typický pro normální HSCs i jejich časně progenitory (Bonnet & Dick, 1997).

Cíl mutací, které jsou zodpovědné za transformaci normálních buněk na buňky leukemické, není zatím zcela vyjasněnou záležitostí. Normální kmenové buňky a LSCs sdílejí schopnost sebeobnovy stejně jako různé vývojové dráhy. Na základě těchto dat byla vyslovena definice LCSs jako HSCs, které se staly leukemickými v důsledku nahromadění mnoha mutací. Existují dva důvody, proč si myslet, že HSCs jsou cílem leukemické transformace. Jedním je fakt, že HSCs mají již aktivované dráhy zodpovědné za schopnost sebeobnovy a jejich transformace je tedy snazší, než aktivování daných drah „de novo“ ve více diferencovaných buňkách. Druhým důvodem je, že kmenové buňky žijí poměrně

dlouhou dobu a mají více příležitostí k nahromadění potřebných mutací, než krátce žijící progenitory. Je také patrné, že oba typy se diferencují na tzv. LTC-IC buňky (long-term culture-initiating cells) a ty poté na CFU (colony-forming units), které se v případě normálních HSCs diferencují na zralé krevní elementy. Za LTC-IC buňky normální hematopoézy můžeme považovat lymfoidní a myeloidní progenitory (viz Obr. 8). V současné době jsou důkazy, že téměř všechny lidské LSCs u AML pochází z mutací nahromaděných na HSCs. Výjimkou je již řečená AML-M3 (viz 4.1). Jedním z důkazů je povrchový fenotyp  $CD34^+CD38^+$  na diferencovaných buňkách, který na HSCs již není přítomen (Bonnet, 2005, Wang & Dick, 2005). Existují však studie, které říkají opak. Podle Goardona a spol. je primární  $CD34^+$  AML progenitorová nemoc, kde LSCs získaly schopnost sebeobnovy až zpětně. Vysvětlují to tím, že LSCs jsou rozděleny na dvě populace buněk, na zralé LSCs, které jsou velmi podobné GMP (granulocyt/macrophage progenitors) progenitorům a nezralé LSCs podobné LMPPs (lymphoid-primed multipotential progenitors), (Goardon et al., 2011).



Obr. 8: Ilustrace normální a leukemické hematopoetické hierarchie (Wang & Dick, 2005)

V případě AML proběhlo mnoho výzkumů hledajících povahu mutací, které by mohly být zodpovědné za transformaci HSCs na LSCs. Cozzio a spol. ukázali, že za transformaci jak HSCs tak myeloidních progenitorů mohou být zodpovědné chromozomové translokace u onkogenů MLL-ELL a MLL-GAS7 (mixed lineage leukemia), (Cozzio et al., 2003). Další onkogenní chromozomální translokace, jako je MLL-ENL je schopna transformace HSCs,

ale už ne jejich progenitorů (So et al., 2003). Také MLL-AF9 může být zodpovědný za transformaci na LSCs (Krivtsov et al., 2006). Později byly tyto chromozomové translokace zjištěny i u jiných typů leukémie.

Co se týká CML, i zde jsou mutace zodpovědné za transformaci stále ještě otevřenou otázkou. LSCs v CML jsou velmi často fenotypově podobné normálním HSCs. CML kmenové buňky prezentují fenotyp také  $CD34^+CD38^-$  a obsahují Filadelfský chromozom  $Ph1^+$  (vzniká fúzí chromozomů 9 a 22). Filadelfský chromozom obsahuje chromozomovou translokaci, ze které poté vzniká chimérický protein z C-konce proteinu c-ABL a N-konce proteinu BCR. Vzniká tedy BCR-ABL chromozomová translokace, která je zodpovědná za expresi BCR-ABL proteinu (Jaiswal et al., 2003). BCR-ABL translokace se nachází i u některých ALL. V případě toho typu leukémie se však soudí, že translokace probíhá až u lymfoidních progenitorů na rozdíl od CML, kde jsou cílem translokace nediferencované kmenové buňky. Těchto poznatků je intenzivně využíváno v terapiích zaměřených právě na léčbu CML (příp. ALL). Léčba zahrnuje aplikaci inhibitorů produktů fúzního genu BCR-ABL (Roeder et al., 2006). V případě ALL také může za transformaci normálních HSCs být zodpovědná TEL-AML1 genová fúze (Schindler et al., 2009). Zatím velmi nevyjasněný původ mají LSCs u CLL. I v případě tohoto typu leukémie proběhla řada výzkumů, které měly objasnit jejich původ. Zatím se v nedávné době podařilo zjistit, že cílem mutací mohou být také HSCs, jako u mnoha ostatních typů leukémií (Kikushige et al., 2011).

V poznání LSCs je velmi důležité si popsat také rozdíly mezi kmenovými buňkami a klasickými leukemickými buňkami izolovanými z nádorové masy. V případě AML jsou fenotypové rozdíly mezi AML LSCs a nekmenovými buňkami AML (AMLs) jasně zřetelné. V případě již diferencovaných buněk v AML se vyskytuje povrchový marker  $CD38^+$  a dále jsou buňky negativní na expresi ABC transporterů. Funkčně se také AMLs liší tím, že nemají schopnost iniciovat nádor u NOD/SCID myší. Fenotypové rozdíly mezi CML-LSCs a nekmenovými buňkami CML jsou také odlišné v závislosti na  $CD38^+$  diferencovaných buňkách. Oba typy se také liší v citlivosti na inhibitory pro BCR-ABL produkty. Necitlivost inhibitorů u CML-LSCs může být důsledkem některých již existujících mutací v genu pro BCR-ABL. Kromě toho CML-LSCs exprimují různé druhy cytokinů a transporterů (Misaghian et al., 2009).

### 5.3 Vlastnosti LSCs

Základní vlastností LSCs (CSCs obecně) je jejich schopnost sebeobnovy (viz 4.2). Také v případě LSCs je tato schopnost výrazně ovlivňována interakcemi s jejich přirozenými „niche“. Řadu těchto vlastností sdílí s normálními HSCs, jako např. Wnt podmíněná  $\beta$ -catenin signální dráha odpovědná za expanzi HCSc z jejich „niche“ nebo interakce zprostředkovaná VLA-4 a VLA-5 integriny (viz. 3.3). Ukazuje se však, že LSCs mají mnohem větší migrační aktivitu než HSCs, což jim umožňuje vyhnout se růstovým inhibitorům, které produkují osteoblasty a stromální buňky. V „niche“ se normálně nachází mnoho proteinů asociovaných s membránami, které mohou být štěpeny MMPs (matrix metalloproteinases). MMPs a jejich tkáňové inhibitory zastávají důležité role ve vývoji a invazivity maligních onemocnění. V případě LSCs se ukazuje, že MMPs by mohly zastávat důležité role při schopnosti sebeobnovy a expanzi mimo jejich „niche“. Proto je v této době vyvinuto mnoho terapií zaměřených na inhibici MMPs (Lin et al., 2002). Wnt/ $\beta$ -catenin signální dráha zastává důležitou roli ve schopnosti sebeobnovy u normálních HSCs a její deregulace je nejspíše jednou z příčin tak rozsáhlé schopnosti sebeobnovy u LSCs. Pokud se  $\beta$ -catenin nachází v komplexu s Wnt, stává se jaderným transkripčním faktorem, jehož konečným produktem jsou růstové faktory jako c-Myc nebo cyclin D1, které vedou kmenové buňky k diferenciaci. Inhibice této dráhy je tedy klíčová pro udržení schopnosti sebeobnovy u LSCs (Zhao et al., 2007). Také polycomb gen Bmi-1 je významným faktorem řídícím schopnost sebeobnovy u LIC v AML (viz. 4.2).

Vlastností LSCs buněk související s jejich schopností sebeobnovy je schopnost „přežívání“. Právě vyhnutí se apoptóze dovoluje LSCs přežít, hromadit další mutace a iniciovat nádorovou masu. Jedním ze známých proteinů spojovaným s drahami „přežívání“ je IL-3 receptor (IL-3R), (Testa et al., 2004). Stimulace IL-3R vede k mnoha signálním drahám, které aktivují např. Mcl-1 (člen Bcl-2 rodiny) nebo NF $\kappa$ B, což jsou antiapoptotické faktory chránící LSCs před apoptózou (Wang et al., 2003). NF $\kappa$ B je aktivovaný v AML populaci buněk, zejména pak v LSCs, ale nebyl zjištěn u normálních HSCs, což naznačuje, že NF $\kappa$ B je klíčový faktor zodpovědný za „přežívání“ LSCs (Guzman et al., 2001). Oba tyto faktory jsou pak nejspíše zodpovědné za rezistenci LSCs k mnoha chemoterapiím, které mají za úkol spouštění apoptotické dráhy. Se schopností „přežívání“ také úzce souvisí vysoce aktivní enzym telomeráza, který nahrazuje zkracující se konce chromozomů (telomery) a tím dává LSCs neomezený replikační potenciál. Aktivní telomerázu mají i normální HSCs, ale zdaleka ne v takové míře jako u LSCs (Warner et al., 2004).



Klíčovou vlastností LSCs pro jejich identifikaci a následnou terapii je exprese povrchových antigenů. Většina povrchových markerů, které jsou exprimovány na LSCs, lze nalézt i na normálních HSCs. Mezi tyto markery patří hlavně CD34 a CD38. CD34 je hlavním povrchovým markerem jak HSCs tak i LSCs. CD38 se vyskytuje pouze na diferencovaných progenitorech. Většina studií ukazuje, že na rozdíl od normálních HSCs, LSCs z AML obvykle postrádají expresi CD90 (Thy-1), CD117 (c-Kit) a CD71 (transferinový receptor). Kromě toho LSCs exprimují CD123 (IL-3R  $\alpha$ ), CD33, CLL-1 (C-type lektin-like molecule-1) a CD96. CD96 byl identifikován jako marker na AML, ale je částečně exprimován i na normálních HSCs (viz 3.3). Z těchto faktorů se jako specifické pouze pro LSCs ukazuje CLL-1 a do nedávné doby i CD123, který byl prokázán v několika málo případech i na normálních HSCs (Jordan et al., 2000, van Rhener et al., 2007, Hosen et al., 2007, Sperr et al., 2005). Dalšími faktory identifikovanými na populaci LSCs jsou CD25 a CD32 (Saito et al., 2010). Jin a spol. zjistili CD44 jako další povrchový marker na kmenových buňkách AML (Jin et al., 2006). Také CD47 byl objeven jako povrchový antigen LSCs (Jaiswal et al., 2009). Dalším markerem LSCs u AML byl identifikován TIM3 (T-cell Ig mucin-3). TIM3 nebyl zatím identifikován na normálních HSCs, a tudíž se jeví jako specifický faktor LSCs (Jan et al., 2011).

## **6. Nové strategie terapie založené na cílení nádorových kmenových buněk**

### **6.1 Cílení LSCs**

Nové strategie léčby nádorů souvisí s nejnovějšími poznatky na poli biologie nádorových kmenových buněk. Je zřejmé, že pro úplné vyléčení většiny nádorů je nutné kompletní odstranění CSCs. Proto je velmi důležité rozlišit CSCs jak od ostatních buněk nádorové masy, tak i od normálních kmenových buněk. K tomu nejčastěji slouží buď rozdílná exprese povrchových markerů, nebo jednotlivé signální dráhy, které jsou pro nádorové kmenové buňky specifické. Protože největší pokroky byly učiněny na případech AML a CML, budou strategie zaměřené hlavně na LSCs.

V současné době jsou v lidské biomedicině nejvíce používány léky, které jsou cílené na některé signální dráhy a dokáží je upravovat nebo blokovat. Příkladem je imatinib (preparát Gleevec), který je inhibítolem produktů fúzního genu BCR-ABL, tedy ABL kináz. ABL kinázy patří do skupiny tyrozinových kináz, které váží ATP (adenozintrifosfát)

a katalyzují přenos  $\gamma$  fosfátu na hydroxylovou skupinu tyrozinu. Imatinib se na ABL kináze váže do stejného místa jako ATP a blokuje tedy jeho vazbu a tím funkci celé kinázy, která je důležitá pro regulaci proliferace, adheze a apoptózy v buňkách CML (Manley et al., 2002). Kvůli těmto vlastnostem se imatinib zdál jako velmi nadějná léčba pro pacienty trpící CML. Ukázalo se však, že není schopen odstraňovat LSCs. Proto byl následně vyvinut nový preparát dasatinib fungující na podobném principu jako imatinib, ale ani ten nedokázal odstranit LSCs. Je tedy patrné, že některé BCR-ABL mutace jsou zodpovědné za vznik rezistence vůči oběma preparátům (Hu et al., 2006).

V současné době je na popředí zájmu cílení LSCs založené na rozdílné expresi povrchových markerů mezi normálními HSCs a LSCs (viz 5.3). Navrhované terapie založené na tomto faktu využívají nejčastěji monoklonálních protilátek (MoAb-monoclonal antibodies) pro úspěšné značení a případně i odstranění LSCs. Proti  $CD34^+$  buňkám byla vytvořena celá řada protilátek. Příkladem může být anti- $CD34$  protilátka produkovaná myším hybridomovým klonem 4H11 ( $CD34$  MoAb 4H11), která inhibuje proliferaci a spouští dráhy apoptózy u  $CD34^+$  buněk (Elknerová et al., 2007). Existují však již protilátky, které jsou cílené proti LSC specifickým povrchovým markerům. Protilátka proti molekule proteinu  $CD33$  poskytuje jeden z možných cílů zásahu. Monoklonální protilátka proti  $CD33$  ( $\alpha$ - $CD33$  MoAb) konjugovaná s antibiotikem calicheamicinem může účinně zabít leukemické buňky některých pacientů s AML.  $CD123$  (IL-3R  $\alpha$ ) je také potencionálním cílem monoklonálních protilátek. Anti-IL-3R $\alpha$  MoAb konjugovaná s ozogamicinem snižuje pravděpodobnost relapsu AML v NON/SCID myších a jeví se účinná i přímo proti LSCs (Tsimberidou et al., 2006). Také protilátka proti  $CD44$  se ukázala velmi efektivní. Na myších modelech bylo ukázáno, že  $\alpha$ - $CD44$  MoAb ukončuje diferenciaci a spouští apoptózu u AML buněk, včetně buněk kmenových (Jin et al., 2006). Dalším povrchovým markerem specifickým pro LSCs je CLL-1 (C-type lectin-like-molecule-1). I proti tomuto antigenu byla vyrobena protilátka anti-CLL-1 MoAb. U těchto typů protilátek však nedochází ke zhoršení životaschopnosti LSCs přímo. Anti-CLL-1 MoAb se váže na povrch kmenových buněk, což ukazuje na možnost asociace s určitými toxiny, které by spouštěly cytotoxické reakce (Bakker et al., 2004).

Další metoda cílení LSCs je založená na změnách v expresi specifických transporterů. Jedná se především o transportery zodpovědné za odtok léčiv z nádorových buněk tedy o ABC přenašeče. Tyto transmembránové proteiny se vyskytují téměř ve všech buňkách a hrají důležité role v jejich fyziologii. Rodina ABC přenašečů je rozdělena do sedmi subtypů ABCA-ABCG. Ukazuje se, že některé jsou exprimovány na AML LSCs na rozdíl

od nekmenové populace leukemických buněk AML. Jsou to především ABCB1, ABCG2 a ABCC1, které jsou považované za důležité geny odpovědné za odolnost LSCs proti léčivům. Dalším velmi podobným typem přenašečů jsou MRP1 (multidrug resistance protein) a BCRP (breast cancer resistance protein). Léčba spočívá v hledání specifických inhibitorů těchto transmembránových přenašečů, které by blokovaly jejich funkci a LSCs by se tak staly náchylnějšími k chemoterapeutické léčbě (de Jonge-Peeters et al., 2007).

Kromě odolnosti LSCs k různým druhům léčiv byl pozorován na pacientech s AML odlišný metabolismus cholesterolu. Souvisí to s tím, že LSCs a leukemické blasty u AML obecně nevykazují efektivní zpětné vazby potlačující syntézu cholesterolu a exprimují LDLR (low-density lipoprotein receptor) i při zvýšené koncentraci sterolů. Tento efekt je spojován s vylučováním cholesterolu z buněk a nejspíše výrazně přispívá k obraně LSCs před chemoterapiemi. Za odtok cholesterolu z buněk je odpovědný jaterní X receptor. Pokud bychom tedy cíleně inhibovali tento receptor, LSCs by se staly mnohem náchylnějšími k chemoterapiím a bylo by možné je odstranit (Li et al., 2003).

Jiným přístupem k odstranění LSCs je určení signálních drah, které jsou jimi aberantně exprimovány a identifikování chemoterapeutik, která by specificky cílila pouze na LSCs. Velmi dobrým příkladem jsou signální dráhy vedoucí k expresi NFκB transkripčního faktoru (viz 5.3) vyskytujícího se pouze v LSCs a nikoli v normálních HSCs. Na základě těchto poznatků byly vytvořeny preparáty, které jsou schopné inhibovat NFκB a tím selektivně cílit pouze LSCs. Jedním z těchto preparátů je seskviterpen lakton parthenolid, který je schopen vyvolat apoptózu u lidských LSCs u AML a také u CML v BC stádiu. Dokonce bylo prokázáno, že je schopen zapínat apoptotické dráhy i u buněk diferencovaných z LSCs (Guzman et al., 2005). Dalším velmi atraktivním cílem pro terapeutické cílení LSCs je PI3K-Akt savič cíl rapamycin (mTOR) dráhy. Kinázy Akt a m-TOR jsou aktivované v LSCs u AML. Léčba spočívá v nasazení inhibitorů PI3K nebo mTOR v kombinaci s cytarabinem a etoposidem, což vede k apoptóze buněk AML a výrazně potlačuje LSCs (Xu et al., 2003). Pozdější studie na myších modelech pokládají mTOR za velmi atraktivní chemoterapeutický cíl pro selektivní eliminaci LSCs. Ukazuje se, že rapamycin jako mTOR inhibitor, je schopen eliminovat LSCs s delecí PTEN genu, což je negativní regulátor PI3K dráhy. Delece PTEN je jedna z nejčastějších genových mutací u LSCs (Yilmaz et al., 2006).

Velmi slibnou metodou pro terapii LSCs je cílení jejich signálních drah odpovědných za regulaci sebeobnovy. Jedním ze základních faktorů regulace sebeobnovy u LSCs je Bmi-1

protein (viz. 5.3), což ho činí potencionálním cílem pro terapie LSCs (Raaphorst, 2003). Za schopnost sebeobnovy u LSCs je odpovědná také signální dráha Wnt. Velmi důležitou roli hraje mutace FLT-3, která byla prokázána asi u 30% případů AML. Proto inhibitory FLT-3 jako CEP-701 potlačují růst FLT-3 mutovaných LSCs (Levis & Small, 2003). V případě Wnt signální dráhy je také velmi důležitý  $\beta$ -catenin (viz 5.3). Chemoterapeutická inhibice  $\beta$ -cateninu vede k potlačení růstu LSCs u CML (Heidel et al., 2012). Také Notch signální dráha může být deregulovaná v LSCs. Genomová analýza LSCs v AML rozlišuje Jagged-2 gen jako ligand Notch. Pro spuštění signální dráhy Jagged a Notch je důležitá  $\gamma$ -sekretáza. Inhibice této sekretázy např. DAPT inhibitorem inhibuje růst LSCs a vede je k apoptóze (Mumm et al., 2000).

## 7. Závěr

Tato práce shrnuje současné znalosti problematiky kmenových a nádorových kmenových buněk. Podrobně popisuje leukemické kmenové buňky včetně možných terapií proti nim zaměřených.

Tématice nádorových a konkrétně leukemických kmenových buněk je v současné době věnována stále velká pozornost. Výsledky mnoha studií prezentují řadu poznatků, které jsou prakticky využitelné a mohly by výrazně napomoci léčbě tak náročných chorob, jako jsou nádorová onemocnění pevných tkání a krevetvorného systému. Právě v terapiích cílených na leukemické kmenové buňky bylo doposud dosaženo největšího pokroku. K tomuto faktu výrazně přispěl vědecký zájem o specifické vlastnosti, které leukemické kmenové buňky odlišují od ostatních tkáňových buněk.

I přes mnoho výzkumů na poli nádorových kmenových buněk není hypotéza jejich existence stále plně zakotvená v povědomí vědecké i laické veřejnosti. Konečným impulsem pro zakotvení této teorie by mohl být úspěch v terapii zaměřené na nádorové kmenové buňky. Příčinou některých neúspěšných terapeutických zákroků může být i fakt, že zatím nebyla nalezena žádná plně spolehlivá charakteristika, která by odlišovala nádorové kmenové buňky od ostatních buněčných populací. Také poznání mechanismů, které ovlivňují existenci nádorových kmenových buněk, je problematickou záležitostí, neboť mnoho vlastností nádorové buňky sdílí s původními normálními kmenovými buňkami. Můžeme tedy doufat, že se podaří kmenové buňky nádorů dokonale odlišit a že jejich specifické vlastnosti budou základem pro vývoj léčiv schopných tyto buňky cíleně odstranit.

## 8. Seznam zkratek

ABC	ATP-binding cassette
ABCB5	ATP- binding cassette B5
ALDH	aldehyd dehydrogenáza
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AML M0	minimálně diferencovaná akutní myelodní leukémie
AML M3	akutní promyelocytární leukémie
AML M4	akutní myelomonocytární leukémie
AML M5	akutní monocytární leukémie
AML M6	akutní erytroleukémie
AML M7	megakaryoblastická leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
AMLs	nekmenové buňky akutní myeloidní leukémie
ATP	adenozintrifosfát
BCRP	breast cancer resistance protein
BMP	bone morfogenetic protein
CFU	colony-forming units
CLL	chronická lymfatická leukémie
CLL-1	C-type lectin-like-molecule-1
CLP	lymfoidní progenitory
CML	chronická myeloidní leukémie
CMLs	nekmenové buňky chronické myeloidní leukémie
CMP	myeloidní progenitory
CSC	nádorová kmenová buňka
CSCs	nádorové kmenové buňky
EGF	epidermal growth factor

EMPs	erytroidní a myelodní progenitory
ESCs	embryonální kmenové buňky
FGF	fibroblast growth factor
FLT-3	FMS-like tyrosine kinase-3
GMP	granulocytové/makrofágové progenitory
GTP	guanozintrifosfát
hESCs	lidské embryonální kmenové buňky
HSCs	hematopoetické kmenové buňky
IL-3R	receptor pro interleukin 3
LIF	leukemia inhibitory faktor
LMPPs	lymphoid-primed multipotential progenitors
LSC	leukemická kmenová buňka
LSCs	leukemické kmenové buňky
MEP	megakaryocytové/erytrocytové progenitory
MLL	mixed lineage leukemia
MMPs	matrix metalloproteinases
MoAb	monoklonální protilátka
MRP1	multidrug resistance protein 1
NFκB	jaderný faktor κ
NK buňky	natural killers buňky
NON/SCID myši	non-obese diabetic/sever combined imunodeficiency disease myši
PI3K	Phosphoinositide 3-kinases
SCs	kmenové buňky
SL-IC	SCID leukemia-initiating cells
SP buňky	side population buňky
SSCs	somatické kmenové buňky
TIM3	T-cell Ig mucin-3

## 9. Použitá literatura

**Ailles LE, Weissman IL.** Cancer stem cells in solid tumors. *Current Opinion in Biotechnology*. 2007, 18: 460-466.

**Al-Hajj M, Clarke MF.** Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene*. 2004, 23: 7274-7282.

**Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morisson SJ, Clarke MF.** Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003, 100: 3983-3988.

**Bakker ABH, Van De Oudenrijn S, Bakker AQ, Feller N, Van Meijer M, Bia JA, Jongeneelen MAC, Bijl N, Geuijen CAW, Marissen WE, Radošević K, Throsby M, Schuurhuis GJ, Ossenkoppele GJ, De Kruif J, Goudsmit J, Kruisbeek AM.** C-type lectin-like molecule-1: A novel myeloid cell surface marker associated with acute myeloid leukemia. *Cancer Research*. 2004, 64: 8443-8450.

**Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto A, Buckle AM, Peault B.** Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992, 89: 2804-2808.

**Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C.** Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia: a report of the French-American-British cooperative group. *Annals of Internal Medicine*. 1985, 103: 620-625.

**Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE.** A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nature Medicine* 1998, 4: 1038-1045

**Bhatia M, Wang JCY, Kapp U, Bonnet D, Dick JE.** Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997, 94: 5320-5325.

**Bhatia M.** AC133 expression in human stem cells. *Leukemia*. 2001, 15: 1685-1688.

**Bonnet D, Dick JE.** Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*. 1997, 3: 730-737.

**Bonnet D.** Normal and leukaemic stem cells. *British Journal of Haematology*. 2005, 130: 469-479.

**Brekelmans P, Van Soest P, Voerman J, Platenburg PP, Leenen PJM, Van Ewijk W.** Transferrin receptor expression as a marker of immature cycling thymocytes in the mouse. *Cellular Immunology*. 1994, 159: 331-339.

**Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH.** Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG- 1a cells. *The Journal of Immunology*. 1984, 133: 157-165.

**Cozzio A, Passegue E, Ayton PM, Karunsky H, Cleary ML, Weissman IL.** Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes*. 2003, 17: 3029-3035.

**Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C, Clarke MF.** Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007, 104: 10158-10163.

**De Jonge-Peeters SDPWM, Kuipers F, De Vries EGE, Vellenga E.** ABC transporter expression in hematopoietic stem cells and the role in AML drug resistance. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2007,62: 214-226.

**Dick JE.** Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*. 2008, 112: 4793-4807.

**Doulatov S, Notta SF, Laurenti E, Dick JE.** Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*. 2012, 10: 120-136.

**Dylla SJ, Beviglia L, Park IK, Chartier C, Raval J, Ngan L, Pickell K, Aguilar J, Lazetic S, Smith-Berdan S, Clarke MF, Hoey T, Lewicki J, Gurney AR, Gilliland DG.** colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS ONE*. 2008, 3: e2428.

**Elknerová K, Lacinová Z, Soucek J, Marinov I, Stöckbauer P.** Growth inhibitory effect of the antibody to hematopoietic stem cell antigen CD34 in leukemic cell lines. *Neoplasma*. 2007, 54: 311-320.

**Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozi E, Biffoni M, Virgilio ADI, Conticello C, Ruco L, Peschle C, Maria RDE.** Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death and Differentiation*. 2007, 15: 504-514.

**Fuchs E, Tumbar, T, Guasch G.** Socializing with the neighbours: Stem cells and their niche. *Cell*. 2004, 116: 769-778.



**Goardon N, Marchi E, Atzberger A, Quek L, Schuh A, Soneji S, Woll P, Mead A, Alford KA, Rout R.** Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2011, 19: 138-152.

**Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, Marks DF, Demaria M, Paradis G, Grupp SA, Sieff CA, Mulligan RC, Johnson RP.** Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nature Medicine*. 1997, 3: 1337-1345.

**Gu Y, Filippi MD, Cancelas JA, Siefring JE, Williams EP, Jasti AC, Harris CE, Lee AW, Prabhakar R, Atkinson SJ, Kwiatkowski DJ, Williams DA.** Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases. *Science*. 2003, 302: 445-449.

**Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D, Grimes B, Howard DS, Rizzieri DA, Luger SM, Jordan CT.** Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood*. 2001, 98: 2301-2307.

**Guzman ML, Rossi RM, Karnischky L, Li X, Peterson DR, Howard DS, Jordan CT.** The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood*. 2005, 105: 4163-4169.

**Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD.** World health organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the clinical advisory committee meeting-airlie house, Virginia, November 1997. *Journal of Clinical Oncology*. 1999, 17: 3835-3849.

**Heidel FH, Bullinger L, Feng Z, Wang Z, Neff TA, Stein L, Kalaitzidis D, Lane SW, Armstrong SA.** Genetic and pharmacologic inhibition of  $\beta$ -catenin targets imatinib-resistant leukemia stem cells in CML. *Cell Stem Cell*. 2012, 10: 412-424.

**Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C.** Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*. 2007, 1: 313-323.

**Hosen N, Park CY, Tatsumi N, Oji Y, Sugiyama H, Gramatzki M, Krensky AM, Weissman IL.** CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007, 104: 11008-11013.

**Hu Y, Swerdlow S, Duffy TM, Weinmann R, Lee FY, Li S.** Targeting multiple kinase pathways in leukemic progenitors and stem cells is essential for improved treatment of Ph+ leukemia in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006, 103: 16870-16875.

**Chen MJ, Li Y, De Obaldia ML, Yang Q, Yzaguirre AD, Yamada-Inagawa T, Vink CS, Bhandoola A, Dzierzak E, Speck NA.** Erythroid/Myeloid progenitors and hematopoietic stem cells originate from distinct populations of endothelial cells. *Cell Stem Cell*. 2011, 9: 541-552.

**Jaiswal S, Jamieson CHM, Pang WW, Park CY, Chao MP, Majeti R, Traver D, Van Rooijen N, Weissman IL.** CD47 Is Upregulated on Circulating Hematopoietic Stem Cells and Leukemia Cells to Avoid Phagocytosis. *Cell*. 2009, 138: 271-285.

**Jaiswal S, Travel D, Miyamoto T, Akashi K, Lagasse E, Weissman IL.** Expression of BCR/ABL and BCL-2 in myeloid progenitors leads to myeloid leukemias. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003, 100: 10002-10007.

**Jan M, Chao MP, Cha AC, Alizadeh AA, Gentles AJ, Weissman IL, Majeti R.** Prospective separation of normal and leukemic stem cells based on differential expression of TIM3, a human acute myeloid leukemia stem cell marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011, 108: 5009-5014.

**Jin L, Hope KJ, Zhai O, Smadja-Joffe F, Dick JE.** Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nature Medicine*. 2006, 12: 1167-1174.

**Jones RJ, Barber JP, Vala MS, Collector MI, Kaufmann SH, Ludeman SM, Colvin OM, Hilton J.** Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells. *Blood*. 1995, 85: 2742-2746.

**Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, Guzman ML, Howard DS, Pettigrew AL, Meyerrose T, Rossi R, Grimes B, Rizzieri DA, Luger SM, Phillips GL.** The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia*. 2000, 14: 1777-1784.

**Keith WN.** From stem cells to cancer: balancing immortality and neoplasia. *Oncogene*. 2004, 23: 5092–5094.

**Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, Mori Y, Iino T, Yamauchi T, Eto T, Niino H, Iwasaki H, Takenaka K, Akashi K.** Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2011, 20: 246-259.

**Krivtsov AV, Twomey D, Feng Z, Stubbs MC, Wang Y, Faber J, Levine JE, Wang J, Hahn WC, Gilliland DG, Golub TR, Armstrong SA.** Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature*. 2006, 442: 818-822.

**Lansdorp PM, Sutherland HJ, Eaves CJ.** Selective expression of CD45 isoforms on functional subpopulations of CD34<sup>+</sup> hemopoietic cells from human bone marrow. *The Journal of Experimental Medicine*. 1990, 172: 363-366.

**Larochelle A, Savona M, Wiggins M, Anderson S, Ichwan B, Keyvanfar K, Morrison SJ, Dunbar CE.** Human and rhesus macaque hematopoietic stem cells cannot be purified based only on SLAM family markers. *Blood*. 2011, 117: 1550-1554.

**Lessard J, Sauvageau G.** Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature*. 2003, 423: 255-260.

**Levis M, Small D.** FLT3: IT does matter in leukemia. *Leukemia*. 2003, 17: 1738-1752.

**Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM.** Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cancer Research*. 2007, 67: 1030-1037.

**Li HY, Appelbaum FR, Willman CL, Zager RA, Banker DE.** Cholesterol-modulating agents kill acute myeloid leukemia cells and sensitize them to therapeutics by blocking adaptive cholesterol responses. *Blood*. 2003, 101: 3628-3634.

**Lin LI, Lin DT, Chang CJ, Lee CY, Tang JL, Tien HF.** Marrow matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMP in acute leukaemia: potential role of MMP-9 as a surrogate marker to monitor leukaemic status in patients with acute myelogenous leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2002, 117: 835-841.

**Liu Y, Rao MS.** Transdifferentiation - fact or artifact. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2003, 88: 29-40.

**Lynch MD, Cariati M, Purushotham AD.** Breast cancer, stem cells and prospects for therapy. *Breast Cancer Research*. 2006, 8: 211

**Magnus T, Liu Y, Parker GC, Rao MS.** Stem cell myths. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2008, 363: 9-22.

**Manley PW, Cowan-Jacob SW, Buchdunger E, Fabbro D, Fendrich G, Furet P, Meyer T, Zimmermann J.** Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor. *European Journal of Cancer*. 2002, 38: 19-S27.

**Maximow AA.** Relation of blood cells to connective tissues and endothelium. *physiological reviews*. 1924, 4: 533-563.

**Misaghian N, Ligresti G, Steelman LS, Bertrand FE, Bäsecke J, Libra M, Nicoletti F, Stivala F, Milella M, Tafuri A, Cervello M, Martelli AM, Mccubrey JA.** Targeting the leukemic stem cell: the Holy Grail of leukemia therapy. *Leukemia*. 2009, 23: 25-42.

**Moore KA, Lemischka IR.** Stem cells and their niches. *Science*. 2006, 311: 1880-1885.

**Mumm JS, Schroeter EH, Saxena MT, Griesemer A, Tian X, Pan DJ, Ray WJ, Kopan R.** A ligand-induced extracellular cleavage regulates  $\gamma$ -secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Molecular Cell*. 2000, 5: 197–206.

**Muñoz L, Nomdedéu JF, López O, Carnicer MJ, Bellido M, Aventín A, Brunet S, Sierra J.** Interleukin-3 receptor  $\alpha$  chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies. *Haematologica*. 2001, 86: 1261-1269.

**Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ.** Cancer stem cells: an evolving concept. *Nature Reviews Cancer*. 2012, 12: 133-143.

**O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE.** A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2006, 445: 106-110.

**O'Brien CA, Kreso A, Dick JE.** Cancer stem cells in solid tumors: an overview. *Seminars in Radiation Oncology*. 2009, 19: 71-77.

**Pera M, Andrade J, Houssami S, Reubinoff B, Trounson A, Stanley E, Ward-VanOostwaard D, Mummery C.** Regulation of human embryonic stem cell differentiation by BMP-2 and its antagonist noggin. *Journal of Cell Science*. 2004, 117: 1269-1280.

**Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE.** Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007 104: 973-978.

**Raaphorst FM.** Self-renewal of hematopoietic and leukemic stem cells: a central role for the Polycomb-group gene Bmi-1. *Trends in Immunology*. 2003, 24: 522-524.

**Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL:** Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001, 414: 105-111.

**Roeder I, Horn M, Glauche I, Hochhaus A, Mueller MC, Loeffler M.** Dynamic modeling of imatinib-treated chronic myeloid leukemia: functional insights and clinical implications. *Nature Medicine*. 2006, 12: 1181-1184.

**Sagar J, Chaib B, Sales K, Winslet M, Seifalian A.** Role of stem cells in cancer therapy and cancer stem cells: a review. *Cancer Cell International*. 2007, 7: 9

**Saito Y, Kitamura H, Hijikata A, Tomizawa-Murasawa M, Tanaka S, Takagi S, Uchida N, Suzuki N, Sone A, Najima Y, Ozawa H, Wake A, Taniguchi S, Shultz LD, Ohara O, Ishikawa F.** Identification of therapeutic targets for quiescent, chemotherapy-resistant human leukemia stem cells. *Science Translational Medicine*. 2010, 2: 17ra9.

**Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Barusevicius A, Miettinen M.** CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. *Modern pathology*. 1998, 11: 728-734.

**Sell S.** Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2004, 51: 1-28.

**Sherley JL.** Asymmetric cell kinetics genes: the key to expansion of adult stem cells in culture. *Stem Cells*. 2002, 20: 561-572.

**Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, Gasser M, Zhan Q, Jordan S, Duncan LM, Weishaupt C, Fuhlbrigge RC, Kupper TS, Sayegh MH, Frank MH.** Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*. 2008, 451: 345-349.

**Schindler JW, Van Buren D, Foudi A, Krejci O, Qin J, Orkin JH, Hock H.** TEL-AML1 Corrupts Hematopoietic Stem Cells to Persist in the Bone Marrow and Initiate Leukemia. *Cell Stem Cell*. 2009, 5: 43-53.

**Schofield R.** The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978, 4: 7-25.

**Schroeder T.** Hematopoietic stem cell heterogeneity: subtypes, not unpredictable behavior. *Cell Stem Cell*. 2010, 6: 203-207.

**Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB.** Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004, 432: 396-401.

**Sládek N, Kollander R, Sreerama L, Kiang D.** Cellular levels of aldehyde dehydrogenases (ALDH1A1 and ALDH3A1) as predictors of therapeutic responses to cyclophosphamide-based chemotherapy of breast cancer: a retrospective study. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2002, 49: 309-321.

**Sneddon JB, Zhen HH, Montgomery K, Van De Rijn M, Tward AD, West R, Gladstone H, Chang HY, Morganroth GS, Oro AE, Brown PO.** Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103: 14842-14847.

**So CW, Karsunky H, Passegué E, Cozzio A, Weissman IL, Cleary ML.** MLL-GAS7 transforms multipotent hematopoietic progenitors and induces mixed lineage leukemias in mice. *Cancer Cell*. 2003, 3: 161-171.

**Soltysova A, Altanerova V, Altaner C:** Cancer stem cells. *Neoplasma* 2005, 52:435-440.

**Sperr WR, Florian S, Hauswirth AW, Valent P.** CD33 as a target of therapy in acute myeloid leukemia: current status and future perspectives. *Leukemia*. 2005, 46: 1115-1120.

**Takahashi K, Yamanaka S.** Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006, 126: 663-676

**Testa U, Riccioni R, Diverio D, Rossini A, Coco FLo, Peschle C.** Interleukin-3 receptor in acute leukemia. *Leukemia*. 2004, 18: 219-226.

**Thayer SP, Di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Castillo CF, Yajnik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL, Hebrok M.** Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature*. 2003, 425: 851-856.

**Till JE, McCulloch EA.** A Direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *radiation research*. 1961, 14: 213-222.

**Till, JE, McCulloch EA, Siminovitch L.** A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1964, 51: 29–36.

**Tropepe, V, Sibilio, BG, Rossant, J, Wagner, EF, van der Kooy, D.** Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in developing mouse telencephalon. *Developmental Biology*. 1999, 208: 166-188.

**Trounson A.** Stem cells, plasticity and cancer – uncomfortable bed fellows. *Development*. 2004, 131: 2763-2768.

**Tsimberidou AM, Giles FJ, Estey E, O'Brien S, Keating MJ, Kantarjian HM.** The role of gemtuzumab ozogamicin in acute leukaemia therapy. *British Journal of Haematology*. 2006, 4: 398–409.

**Van Rhenen A, Van Dongen GAMS, Kelder A, Rombouts EJ, Feller N, Moshaver B, Walsum MSV, Zweegman S, Ossenkoppele GJ, Schuurhuis GJ.** The novel AML stem cell associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells. *Blood*. 2007, 110: 2659-2666.

**Wang JCY, Dick JE.** Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends in Cell Biology*. 2005, 15: 494-501

**Wang JM, Lai MZ, Yang-Yen HF.** Interleukin-3 stimulation of mcl-1 gene transcription involves activation of the pu.1 transcription factor through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Molecular and Cellular Biology*. 2003, 23: 1896-1909.

**Warner JK, Wang JCY, Hope KJ, Jin L, Dick JE.** Concepts of human leukemic development. *Oncogene*. 2004, 23: 7164-7177.

**Weissman IL, Shizuru JA.** The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood*. 2008, 112: 3543-3553.

**Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW.** Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Developmental genetics*. 1996, 18: 173-179.

**Wu C, Wei Q, Utomo V, Nadesan P, Whetstone H, Kandel R, Wunder JS, Alman BA.** Side population cells isolated from mesenchymal neoplasms have tumor initiating potential. *Cancer Research*. 2007, 67: 8216-8222.

**Xu Q, Simpson SE, Scialla TJ, Bagg A, Carroll M.** Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood*. 2003, 102: 972-980.

**Yilmaz ÖH, Valdez R, Theisen BK, Guo W, Ferguson DO, Wu H, Morrison SJ.** Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature*. 2006, 441: 475-482

**Zhao C, Blum J, Chen A, Kwon HY, Jung SH, Cook JM, Lagoo A, Reya T.** Loss of  $\beta$ -catenin impairs the renewal of normal and CML stem cells in vivo. *Cancer Cell*. 2007,12: 528-541.

**Ziegler BL, Valtieri M, Porada GA, De Maria R, Müller R, Masella B, Gabbianelli M, Casella I, Pelosi E, Bock T, Zanjani ED, Peschle C.** KDR Receptor: A key marker defining hematopoietic stem cells. *Science*. 1999, 285: 1553-1558.